## XP-002409431

PAN - (SARA ) OTSUKA PHARM CO LTD

PD - 1999-06-08

```
(C) WFI / Thomson
 AN - 1999-389392 [33]
 AP ~ 3P19970336516 19971119
 CPY - SAKA
 DC - B02
 DW - 199933
 IC - A61X31/495; C07D215/22
 LNXA- 1995-114894
 M2 - [01] D012 D013 D021 D022 D622 F011 F014 F553 G001 G011 G012 G013 G014
       cols cols clop H1 H121 H141 H2 H201 H211 H5 H541 H543 H8 J0 J011 J3
       7331 JS 7521 L9 L941 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222
      M323 M274 M275 M276 M231 M232 M233 M272 M281 M282 M320 M412 M511 M521
       M531 M540 M710 M503 M504 P522 P631 P714 P721 P723; 9933-ACTOL-M
       9933-ACT01-T
 MC - E06-D02 E07-D11 S14-D01 B14-F01 B14-N01 B14-N10
 PA - (SAKA ) OTSUKA FRARM CO LTD
                        A 19990508 DW199933
    - JP11152228
 PR - JP19970336516 19971119
 XIC - ASIX-031/495; C07D-215/22
 AB - TSC-27 inducers contain piperarinyl carbostyril compounds of formula
       particularly vacuations (i.e. (I; R = 3,4-dimethoxybentoyl at C6
       position, and optional bond is absent)).
     - USE :
       Por prevention and treatment of osteoporosis, andcorine diseases,
       cardiac and renal diseases caused by water retention, including
       cardiac failure at doses of 0.5-30 mg/kg/day up to 4 divided doses.
       For predicting and prevention of blood, liver or apleen toxicity.
 IN - INDUCE TREAT OSTEOPOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC REMAL CAUSE WATER
       RETAIN
 IWW - INDUCT TREAT OSTROPOROSIS ENDOCRINE DISEASE CARDIAC RENAL CAUSE WATER
       RETAIN
 NG - 1
 NPW - 1
 OPD - 1997-11-19
```

TI - TSC-32 inducers - for treating e.g. osteoporosis, endocrine diseases,

cardisc and renal diseases caused by water retention

(19)日本国特許庁(JP)

# (10)公開特許公報(A)

(11)特許出職公開審号

特期平11-152228

(43)公開日 平成11年(1939) 6月8日

(51) int CL* A 6 1 K 31/46	SESSES AED ABI ABN ACV ADT	家院養養	F) 八百	1 %	31/495 第の数 3	£1)	AED ABJ ABN ACV ADT (2:17-36)	最終資に続く
(21) 部配器号	特额平9-336516		(71)	出線人	000208	956		
(22) II <b>II</b> II	平成9年(1987)11月19日	大塚製業株式会社 東京都千代田区神田的町 3 * (78) 発明者 川又 均 修島異徳為市前佐古六番町					6-12 ライオ	
			(72) }	智彩者	ČĐ :	光谱	之稱為南佐古 八万町下紹元	
			(74) (	大雅人	弁理士			10%)

## (54) [经明の名称] TSC-22数据制

(57) [聲約] 【構成] 本発明注。一般式 【化1】

〔式中、日は、フェニル環上に低級アルコキシ基を有することのあるペンゾイル基を示す。カルボスチリル骨格の3位と4位との鉄業間結合は、一道結合又は二重結合を示す、〕で表わされるカルボスチリル誘導体又はその返を有効成分とするTSC-23誘導解を提供する。 【効果】本発明TSC-22誘導解は、該影響作用に基づき骨積鬆緩を始めとする骨形成不全症の治療、心疾患、管疾患の治療に有用である。 【特許請求の報酬】 【請求項1】一般式 【他1】

「式中、Rは、フェニル環上に額機器として低級アルコキシ基を有することのあるペンディル基を示す。カルボスチリル骨格の3位と4位との振器開始合は、一般結合スは二重結合を示す。」で表されるカルボスチリル誘導体及びその場から超ばれる多なくとも1種の化合物を有効能分として含有することを特徴とするTSC-22誘導制。

【請求項3】 カルボスチリル誘導体が6-(4-(3,4-ジメトキシベンダイル)-1-ビベラジニル)-3,4-ジヒドロカルボスチリルである請求項1 に記載のTSC-22誘導剤

[発明の許額な説明]

100011

【発明の属する技術分析】本発明は、特定のカルボスを りル誘導体を有効成分とするTSC-22誘導剤に関す る。本発明のTSC-22誘導剤は、TSC-22遺伝子 の発理誘導作用を有することに基づいて、骨御整確を始めとする骨形域不全症、内分泌疾患あるいはそれに統発 して起こる水分時間による心疾患、物疾患の治療に育用 である。また、上配作用は、当該誘導剤の副作用として の無額粒球症の発症機構を解明するのに有用であり、そ の発症の予測あるいは予防法の開発においても有用である。 る。

#### 100021

【従来の技術】6 -- (4 -- (3,4 -- シメトキシベンソイル) -- 1 -- ビベラシニル) -- 3,4 -- ジとドロカルボスチリル(以下、ベスナリノンともいう。)を始めとするカルボスチリル誘導体は、慢性心疾患の治療に用いられる経口変力剤(oral instropicagent)として開発され(J. As. foll. Cardio. 9: 865-871 (1997))、近年、上ト極飛騰絡総認様(husan solivery gland concerceil line: 以下、TYS細胞ともいう、: As. J. Pathol. 124: 4%-509 (1996))を含む幾つかの翻瘍細胞に対して、インビボ及びインビトロで、抗増殖活性並びに対化一及びアボトーンスー誘導活性を有することが報告されている(Acta Mistochem、Cytochem、277: 591-599 (1994): Capcer Lett. 91:1-9 (1995))、このため、日本では、該化合物を有効成分とする薬物が調剤部の固形腫瘍に対する核密剤として臨床試験に係されている。

【99日3】我々は、最近、TYS細胞をベスナリノン で処理することにより、TGF-81mRNA及びp2 [0004]

【発明が解決しようとする認題】本発明は、ベスナリノン等のカルボスチリル誘導体の新たな作用、並びにその作用に基づく新規用途を提供することを目的とする。より具体的には、本発明はベスナリノン等のカルボスチリル誘導体又はそれらの塩のTSC-22誘導網としての新規用途を提供することを目的とする。

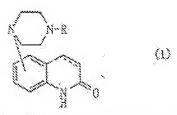
[00005]

【課題を解決するための手段】本発明者もは、ベスナリノンを始めとする特定のカルボスチリル誘導体の新規開金を開発すべく、設定研究を重ねていたところ。TYS 細胞をベスナリノンで処理することによりTSC-22 mRNAの発援が開金されることを見出し、また誘導されたTSC-22が細胞の成長・増殖金びにCNP(6元 yes antriuretic poptide)を介したTGFのや1FNーで等のサイトカインの発現調節に落づく細胞内のシグナル伝達系の促進(Eur. 4. 6)oches.、242、460-36(1986))といった細胞作用及び細胞機能の制御に重要な役割を果たしていることを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

【6006】すなわち、本発明は下記一般式(1)で表 わされるカルボスチリル結婚体及びその塩から選ばれる 少なくとも1種の化合物を有効成分として含有すること を特徴とする下SC-22誘導剤である。

100071

[42]



また本発明は、上記カルボステリル誘導体がも一て含一 (3、4ージメトキシベンゾイル) --1 -- ビベラジニ ルエー3、4 -- ジヒドロカルボスチリルである上記下S C~2 2誘導剤である。

【0008】本発明の誘導剤は、後記実験例に示すように、TGF-81等のタンパクの産生を介して或はこれを介することなく前接に、上記所認のTSC-22遺伝子の発現を誘導するものである。

【0009】TSC-22遺伝子は脳や心臓での発現が高く、脾臓や肝臓では発現が低く、末柄血では治ど発現していないことが知られている。また当該遺伝子は、TGF-&で骨芽細胞を処理した後直もに誘導されること、またFSHなどのホルモンに応答して誘導されることが明らかにされている。更に、TSC-22は、Cタイプナトリウム利尿ベブチト(CNP)のアロモーター

観察に結合し、その転写を直接誘導することも知られて いる。

【0010】このため、本発明TSC-22誘導剤は、 青和軽症等の骨形成不全症、内分泌疾患、あるいなそれ に連発しておこる水分質質による心疾患、腎疾患等の各 種疾患の治療、予防薬として有用である。また、本誘導 剤を含む各種薬剤による血液毒性、肝・脾素性の発現の 予測あるいな予防法の開発に有限となる。

#### [0011]

【発明の実施の形態】上記一般式(1)において示される各基は、より具体的にはそれぞれ次の通りである。即ち、低級アルコキシ基としては、例えばメトキシ、エトキシ、プロボキシ、イソプロボキシ、ブトキシ、tertープトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ基等の炭業数1~6の直鎖又は分性鎖状アルコキン基を例示できる。

【0013】フェニル環上に遊機基として紙級アルコキシ姦を有することのあるペンダイル基としては、例えばベンゾイル、2ーメトキシベンダイル、3ーメトキシベンダイル、3ーメトキシベンダイル、3ーメトキシベンダイル、3ーイソプロボキシベンダイル、4ーエトキシベンダイル、3ーイソプロボキシベンダイル、4ーズトキシベンダイル、3ーペングイル、3ーペキシルオキシベンダイル、3・4・5・ドリメトキシベンダイル基等のフェニル環上に遊機基として供菜数1~6の遊館状又は分枝締状アルコキシ基を1~3個有することのあるベンダイル基を倒派できる。

【0013】本発明において有効成分とする上記カルボスチリル誘導体中、特に好ましいものとしては、例えば ちー(4~(3,4~ジメトキシベンゾイル)-1~ビベラジニル)-3,4~ジモドロカルボスチリル(「ベスナリノン」)を例示できる。

【0014】上記カルボスキリル誘導体の塩には、適常の酸を用いて形成される薬理学的に許等される酸性加塩が包含される、酸塩を形成する酸性化合物としては、具体的には例えば暖酸、リン酸、硝酸、塩酸、異化水素酸等の無機酸、遊酸、高酸、マレイン酸、フマール酸、リンゴ酸、適石酸、クエン酸、コハク酸、エタンスルホン酸、ウートルエンスルホン酸、安息香酸等の有機酸を例示することができる。

【0015】なお、一根式(1)で表ざれるカルギスチ リル誘導体及びその塩は、例とば特公平1-43747 号公器に記載される製法に従って製造することができ る。

【0016】本発明の誘導剤の有効成分である一般式 (1)のカルボスナリル誘導体又はその塩は、通常、一般的な医薬製剤の形態で用いられる、かかる製剤は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、潜電剤等の希釈剤乃至以形形を用いて

調難される。この医薬製剤としては各種の形態が治療目 的に応じて選択でき、その代表的なものとしては銃猟。 **丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カブセル** 御、生剤、注射剤(液剤、処理剤等)等を例示できる。 【6017】錠剤の形態に成形するに難しては、損体と してこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば 乳糖、白糖、塩化ナトリウム。ブドウ糖、尿薬、デンブ ン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ・ 酸等の賦形剤、水、エタノール、プロバノール、単シロ って、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボ キシスチルセルロース、セラック。メチルセルロース。 リシ酸カリウム、ボリビニルビロリドン等の結合剤。乾 優テンプン、アルギン数ナトリウム、カンテン家、ラミ ナラン末、保管水業ナトリウム、炭酸カルンウム、ボリ オキシエチレンソルビタン脂肪糖エステル類、ラウリル 筋酸ナトリウム、ステアリン酸モングリセリギ、デンア ン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバタ 一、水管造加油等の崩壊抑制剂、第4級アンモニウム等 器、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリ ン、モンズン等の保湿剤、デンブン、乳糖、カオリン、 ベントナイト、コロイド状ケイ教等の職着剤。精製タル ク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ホリエチレングリコー ル等の常沢耐等が例示できる。更に統制は必要に応じ通 常の割皮を施した錠剤、両差は糖去錠、ゼラチン被色 錠、関格複錠、フィルムコーティング鍵に測裂すること もできるし、また工業鏡、多層鏡とすることもできる。 【0018】丸剤の形態に成形するに際しては、担体と してこの分野で従来公知のものを広く使用できょ例えば ブドウ糖、乳糖、デンブン、カカオ脂、斑化植物油、カ オリン、タルク等の敵形剤、アラビアゴム家、トラガン ド末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラシカ ンテン等の崩壊削等が展示できる。

【0019】生剤の形態に成形するに際しては、福床として従来公知のものを広く使用でき、例えばボリエナレングリコール。カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、単合成グリセライド等を挙げることができる。

【0020】注射剤として調製される場合には、液剤及び整層剤は設備され、且つ血液と等質であるのが好ましく、これら液剤、乳剤及び整菌剤の形態に成形するに難しては、希釈剤としてこの分野において機用されているものを全て使用でき、例えば水、エナルアルコール。アロビレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ボリオキシ化イソステアリルアルコール、ボリオキシエチレンソルビタン監防酸エステル類等を挙げることができる。尚、この場合等現性の溶液を測裂するに充分な量の食器、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有させてもよく、また通常の溶解剤助剤、緩衝剤、無病化剤等を添加してもよい。

【0021】更に本発明の移落剤の中には、必要に応じ

て着色剤、果存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の悪薬 品を含有させてもよい。

【0022】本発明の誘導剤中に有効収分として含まれ る式(1)で示されるカルボスチリル誘導体又はその塩 の業は、特に限定されず広範囲より遠愴選択されるが。 通常会組成物中約1~70重量%。好ましくほ約1~3 ○重量光程度の範囲とするのが適当である。

【0023】かくして得られる本発明の誘導剤の損毒力 法は特に制御はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性 期、その他の条件、疾患の程度に応じて決定される。何 之ば、往射剤形器の医薬製剤として調製した場合には、 新歷的。新四的。故下。故的。施胜内投与等により投与 され得る。これは必要に応じてブドウ糖、アミノ酸等の 通常の確認と混合して舒脈内投与することもできる。最 新、丸湖、颗粒浦、カブモル制等の個別形態や経口投与

> ベスナリノン デンプン マグネシウムステアレート 21.88 200

1 統中、上記組成物を含有する緩縮を製造した。 100271

> ベスナリノン 150 g アビセル(商際名。種化成株式会社製) 408 コーンスターチ 30g ステアリン酸マグネシウム 2 33 とドロキシプロビルメチルセルロース 108 38

ボリエテレングリコールー6000 とマシ油 X J James 12

上記有効成分化合物。アビセル。コーンスターチ及びス デアリン酸マグネシウムを混合研磨後、糖素R10mm のキネで打錠する。得られた紋刺をヒドロキシブロビル メチルセルロース、ポリエチレングリコールー600 り、ヒマシ油及びメタノールからなるフィルムコーティ

[0028] [300003]

ベスナリノン 150.0% クエン領 1.0% ラクトース 33.5% リン酸ニカルシウム・ 70.0% ブルロニックドー68 30.0g ラウリル硫酸ナトリウム 15.0g ポリビニルビロリドン 15.00 ポリエチレングリコール (カルボワックス1500) 4.5% ボリエチレングリコール(カルボフックス6000) 45. 0g スーンスターキ 30.0g 戦級ラウリル硫酸ナトリウム 3. 0 x 乾燥スタアリン酸マグネシウム。 3. 0g エクノール W W.

上記有効成分化合物。クエン酸、ラクトース、リン酸二 カルシウム、ブルロニックドー6%及びラヴリル硫酸ナ トリウムを混合する。

【0029】上記混合物をNo. 60スクリーンにて篩

用液剤が魅力器薬薬剤とする場合は、経口又は経腸投与 され得る。また坐解は直腸内投与できる。

【0024】 本発明の誘導剤の授与量は、広範囲から適 軍選択でき、特に限定されるものではないが、過常一般 式(1)のカルボスチリル誘導体又はその塩が、一日当 り体重1kg当り約0.5~30mg程度の範囲から離 探される策とされるのがよく、また投与単位形態中にこ れらの有効成分が約10~1000mg含有されるのが 適当である。また本発明の下SC~2.233等割の投与 は、一日1回スは一日3~4回に分けることもできる。

100251 【実施署】以下、本発明を更に詳しく認明するため説剤

例及び実験例を挙げる。

100261 [48869] [1]

> S 81 2 132mg 18mg45mg 200mg

( MANUT 2 ]

ング剤で被覆を行ない。フィルムコーティング鍵を製造 A 22 :

408

別し、ボリビニルビロリドン、カルボワックス1500 及びカルボワックス6000を含むアルコール性溶液で 機式粒状化する。必要に応じてアルコールを添加し、物 本をペースト状塊にする、コーンスターチを添加し、物 一な粒子が形成されるまで混合を続ける。No. 10ス クリーンを通過させ、トレイに入れ、100℃のオープ ンで12~14時間乾燥する。乾燥粒子をNo. 16ス クリーンで部別し、乾燥ラウリル硫酸ナトリウム及び乾燥ステアリン酸マグネンウムを加え、混合し、抗酸機で 所製の形状に圧縮或形する。

【00分0】上記志部モワニスで処理し、タルクを散布して凝集の吸収を防止する。志部の周囲に下塗り層を検 復する。内服用のために充分も回数のワニス核繁を行な う。終剤を完全に丸く且つ滑らかにするために、更に下 塗り層及び平滑被覆を適用する。所望の色合が得られる まで着色核製を行なう。乾燥後、液覆旋期を磨いて均一 な光沢の統則を調製する。

#### [0031]

【実験例】以下に記載する実験機で使用するペスナリノン及びTYS細胞の調製。並びに実験例で用いた種々の 操作は、次の方法に従って行った。

【0032】(1)ベスナリノン溶液の調製 ベスナリノンは、予めジメチルスルポキシド(DMS の)を用いて10mg/m1濃度のストック溶液として 調製しておいた。酸ストック溶液中のベスナリノンの抗 環源活性は、4でで少なくとも1ヶ月間安定であった。 使用する前に完全培地で希釈して、所望漆底に調製して 用いた。

【0033】(2) TYS細胞の調製及び培養: ヒト糖 液腺精平上皮癌細胞TYS (As. J. Pathol., 124, 4%-5 め (13%6))は、10%存ウシ血液(PC5; Blo-Whittake r)、100μg/m+ストレプトマイシン、1000 /m+ペニシリン(Gibco Laise,)及び0.25μg/m 1アンホテリンB(Gibco Laise,)を添加したダルベッ コ改変イーグル培地(DMSM; GibcoLabs.)を開いて、9 5%変気及び5%CO(存存下、深等囲気下において3 7でで検養することにより、測製した。

【9034】(3) ボリメラーゼチェーンリアクション (PCR)

PCRは、反応液中の機能もNTPs速度及び設計プライマー速度をそれぞれ200μM及び1μMとし、該反 応流にTagDNAボリメラーゼ(Talara)を最終速度が 0.05U/μ1となるように加えて、サーマルシーク エンサー(Isaki Glass)を用いて行った(94℃3分。 94℃1分。55℃1、5分。72℃2、5分の30サイクルと72℃4分の延長)

#### (4) ノーデンブロット解析

和股質RNA (20/µg) を、ホルムアルデモド/1、0

%アガロースゲルにて電気洗動し、これをサイロシフィルター (fybond-ド: Asersham) にブロットした。この

ナイロンフィルターを、50%ホルムアミド、5×生理 食塩-リン数ナトリウムーBDTA (saline-sodius ph esphale-EDTA)、0、1%SDS、5×デンハルト (be diardi's)溶液及び100μg/mlサケ結子DNAタ 在下に、42℃、15~20時間、\*\*P標識にDNAプ ロープとハイブリダイゼーションを行った。0、1×S SC (standard soline clirate) -0、5%SDSに て、室温で2回及び50℃40分間にて1間、十分に洗 浄した。X線フィルムペの業光は、細胞スクリーンを用 いて-70℃で行なった。

【0035】使用したプローブは、ヒトTSC-22e DNAの3 未端(1、2kb)、TYS細胞よりクローン低した完全なオーフンリーディングフレームを有するヒト 21\*\*\*\*\*10 DNAの875 bpフラグメント (Camer Lett. 112: 181-189 (1997))及びヒトルーアクチンPHFBA―1 (ATC %0.7764;88%CA6) のX かの1—Xino1フラグメント (2.1 16) である。【0036】シグナルのデンシトメトリック解析は、NIHイメージ1、44プログラム及び/XはBAS-200011イメージ解析システム (Fuji photo file) に

【0037】寒躁緩1、インビトロ細胞増殖に対するべ、 スナリノンの影響

よって行なった。

TYS細胞のインビトロ増殖に対するベスナリノンの影響(抗増殖作用)を、MTTアッセイ法(3-43/4-ジメチルーチアゾールー2-イル)-2.5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド)(Cancer Res. 47:9%-942 (1967))を用いて評価した。

【0038】 具体的には、96ウエルブレート (Paleo n: Decton Dickloson Laboure) の10%FC Sを含む DMEM中に、TVS細胞を2×10%細胞/ウエルと なるようにまいた。24時間後、細胞を、稀々の過度のベスナリノン(0,0.1,1,10,50ヵg/m1) を含むDMEM(10%FC S含有) 焙地中に移し、2~4日後、MTT(Signa) を用いたアッセイにより細胞数を定量した。

【0039】結果を図1に示す。これから分かるように、ベスナリノンは0、1 μg/m1~10 μg/m1の港度ではTYS細胞の増殖を殆ど抑制しなかったが、50 μg/m1の機度では著しく抑制しな、ベスナリノンのTYS細胞に対する増殖性害活性は、細胞静止性であるが細胞致死性ではなかった。50 μg/m1のベスナリノンで処理したTYS細胞は拡大し細胞分裂が停止したが、増養銀の底から削離しなかった。

【0040】また。ベスナリノン調製用溶媒として用いたDMSOの抗増殖作用を確認した。結果、DMSOは 協かにTYS網胞の増殖を服务したものの。ベスナリノンの抗増殖作用に比較してその程度は非常に低かった。 【0041】実験例2 細胞周期解析

TVS細胞を、ベスナリノン(50gg/m1)の存在

又は非存在下で、24時間、48時間及び72時間培養 した後、コニカルチューブ(Falcon)に集め、該細胞を 70%エタノールで関定して、リン糖経菌生理食塩水で 洗浄した。100±8/mlのENaseA(Signa)で処 理後、細胞を40±8/mlのpropidius iodide(Mojecular probes)で染色し、次いて細胞周期をデジタルフローサイトメトリーシステムがICS(Coulter)で解析した。

【0032】ベステリノン未処理群のうち50%のTY S細胞が、短地を換えた接34時間でS相及びG2/M 類を折した。しかしながら、48時間及び73時間接に は、これらの開を示す細胞の割合は徐々に減少した(図 2及び表1)。これはおそらく、原地中の成長因子の清 種及び/又は接触関等による地強抑制に起題するものと 考えられる。一方、ベスナリノン処理群では、最物活物 後24時間で8種及びG2/M期を示す細胞の割合は、 上記未処理器よりも非常に少なかった(図2及び表 1)、ベスナリノンで48時間以上幅すると、殆どの丁 Y S細胞はG1期で停止した(図2及び表1)。 【6043】

	未然整丁YS鄉族			#ETYS##				
***************************************	_24.h	48.h	72 b_	24 h	48 h	72 h		
60/6}	58. S¥	56. 5%	72-73	78, 28	81-88	92. 98		
\$	24.6%	17. 8x	11. 18	18.38	7. 2%	2.0%		
G2/N	20a.3%.	21.78	15. 23	11.08	5. 4%	4.7%		

これらのことから、ベスナリノンはG 1 アレストを誘導 することによって細胞増殖を抑制することがわかる。 【O 0 4 4】実験所3」 ヒトアSC-2 2 c D N A の単 新

ベスナリノンで処理したTYS細胞から構築した。DNAライブラリーからベスナリノン誘導遺伝子としてTSC-22cDNAを卓羅した。異体的には、次の方法により行った。

[0045] (1) RNAの単鍵。

TYS細胞をベスナリノン(50μα/ml)で3日間 処理した。次いで、得られた鍵胞をSonidet p-40 (Signal)を含む低限緩壊液により溶解し、核 (moclei)を除去して、総細胞質RNAを測裂した。該総細胞質RNAについてオリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーを2サイクル行うことにより、Poly(A)\*RNAを測製した。

【0046】(2)。CDNAライブラリーの構築 得られたPoly(A) RNA5μgをオリゴ(d)→Xhol アラ イマーノリンカー(Stratasene)を用いたM-MLV (Glice)によって逆転等した。セカンドストランドで DNAを、CDNA合成キット(Stratasene)を用いて 合成し、該キットの手引器に従ってEcoRlアダブタ 一をライゲートした。該合成CDNAをXholで切断 (法、予め居CORIESallで消化したおいたクロー ニングペクターズAP Express(Stratasene)にライゲートした。該CDNAは、ベクター中の直接細胞及び原 移細胞のアロモーターよりアンチセンスーオリエンテー ション(antisense orientation)に移入された。一次 でDNAライブラリーは、約1.5×105クローンを含 んでおり、90%が組織体であった。2AP Expressラ イブラリーは1個増縮役に用いた。

【0047】(3) ランダムシークエンシング

ベスナリノン処理TVS細胞から稼締した上記eDNA ライブラリーからランダムに107個のクローンをシー クエンスした。

【9048】具体的には、ランダムに選択したでもドー CMV-ライブラリー・形質転換コロニーを爪得技で捻い上げ、ラ0μ8/m1のカナマイシンを含むらか1の しB境地中で終疫培養した、ファージミドをアルカリライシス法により独出し、該ファージミドの半分を至っる RIとPstIで消化して、cDNA挿入断片を切り出した。挿入断片の殆どは0.5~2kbのサイズ範囲であった。該断片をアガロースゲルからGene Clean Kit I 1 (8io 101)を用いて精製し、ノーザンブロット分析用のアローブとして用いた。

【〇〇49】残り平分のファージミドをシークエンシング分析に係した。○DNAの役列をF1TC極線プライマー及びTakara Tag Cycle Sequencing Kit着しくはAmeraham Thermo Sequencing Cycle Sequencing Kit (Ameraham Thermo Sequencing Cycle Sequencing Kit (Ameraham Thermo Sequencing Cycle Sequencing Kit (Ameraham Thermo Therm

【0050】その結果、クローンの約64%が公知の進 伝子であり、18%がデータベースには記録されている ものの機能的には下明な遺伝子であり、18%が未知の 遺伝子であった。

【0051】公知適伝子において、ベステリノン処理工 YSライブラリーのハウスキーピング遺伝子の割合は、 普通に構築された(ベスナリノン未処理)をDNAライ ブラリーのそれと比べて少なかった、このことから、ベ スナリノン処理は、ハウスキーピング適位子の発環を低下させ、TYS細胞における細胞増殖、アボトーシス及び分化に関連する適位子の発現を相対的に増加させることがわかった。公知適位子の約30%(例えば、TSC-22、HSC70、CK19、SOS、NGFR関連リンパ球活性化分子、IL-6、TAPJIA、エロンゲーションファクターーまで、IL-1/TNF診察にST、DNA結合タンパクA、アネキシンII、DNA体存性蛋白キナーゼ触媒サブユニット、ドab-GD1、SUII翻訳開始固子、リソソーム防御タンパク、TNF-2誘導タンパクB12、ADP-リボシレーション図子、ホスポリパーゼA2及び13kDa分化関連タンパク等)が、細胞増殖、分化及びアホトーシスに関連しているようである。

【0092】また、ノーザンブロッティングを用いて、上記公知遺伝子及び未知意伝子の光環を、ベスナリノン未発達TYS細胞とベスナリノン処理TYS細胞との間で比較した。その結果、ベスナリノン処理によりTSC-22mRNAの飛環が増加することが明らがとなった。しかしながら、他の遺伝子の飛環はTYS細胞のベスナリノン処理によって実化しないが、減少していた。【0053】(4)ヒトTSC-22cDNAの単離ランダムシークエンシングで得られたクローン(pBK-CMV-トTSC-22cDNAフラグメントだけを含み、死金なオーアンリーディングフレームを含んでいつかったため、完全長のヒトTSC-22cDNAをクローン化することを試みた。

【0054】アンチセンスオリエンテーションフォーム CMVプロモーター中にベスナリノン処理TYSEDN Aを含む100ngのpBK-CMVライブラリーを、 DP1プライマーを用いてPCRにより増幅した。

【0055】次いで、cDNAの上海に例在するT7RNAボリメラーゼプロモーターをベクターに挿入した。 別多線いで、PCR生成物を第2ラウンドのPCRに供 した、第2ラウンドPCRにはプライマーとして、DP 1プライマーの7bp上海に所在しPstlサイトを含むDP2プライマー、およびマウスTSC-22の翻訳 開始コドンから92bp上流またはラットにおける84 bp上海に位置するマウス及びラットのTSC-22版 列から取得されるmUPを用いた は、Biol. Ches. 36 7:19219-10224(1992): Endocrinelogy 134: 1205-1212 (1994))。

【0056】とトTSC-22の5、末端を含む第2ラウンドのPCR生成物をpUC19ペクターにサブクローンした(pUC19-hTSC-22の5、末端)。pBK-CMV-hTSC-22の3、末端に由来するFatl-活化れてSC-22の3、末端フラグメントを、子めFatlで消化しておいたpUC19-hTSC-22の5、末端にライゲートした。これからほぼ完全長のヒトTSC-22-cDNAが単雑された。

【0057】用いた各種プライマー及びプロモーターの 塩基配列を表2に示す。

(00581 (\*21

プライマー リテル: 5 -agecaptotgeagotggacotgaa-8

DF 2 : 5'-totecogoteggootegasacteggo-3'

m UP / 5'-efctenttleneccepscia-3'

TTRNAポリメラーセプロモーター

: 5'-testacyacicactalaggg-3'

本発明において難談職務細胞様から取得されたとしてSC-22のタクレオチド説別は、ジョイ等によって最近と上部規(extryo)から取得されたものと完全に一致した(Blochen, Blochen, Bicoleys, Bes, Comm, 222: 821-826 (19%))、ヌクレオチド配列分析によって、ヒトTSC-22遺伝子は、マウス又はラットTSC-22遺伝子と総して79%のホモロジーがあることがわかった。しかし、ヒトTSC-22のコーディング領域におけるヌクレオチド影別は、マウスズはラットTSC-22のそれと92%一致した。

【0059】一方、それから推定されるヒトTSC-2 2タンパクのアミノ酸酸等以、マウス又はラットTSC-22タンパクのそれと98%一致した。マウス及びラットのTSC-22タンパクは143億のアミノ酸を含んでいるのに対して(Shibanuma et al.. J. Biol. Chem. 287, 10219-10224(1992): Hamil and Hall. Endocr inology 134、1205-1212 (1994))、とトTSC-22タンパクは144個のアミノ酸を含んでいた。また、とトTSC-22では、コドレ43位にセリン残器が一個物入されており、マウス及びラットにおけるコドレ141位のセリン残器(たトではコドレ142位)がプロリン残器に関摘されていた。また。とトTSC-32タンパクには、ロイシン-77~ロイシン-98の領域にロイシンジッパー様構造が保存されていた。

【0060】なお、TSC-22タンパクは、ロイシン ジッパー洗精法を育するタンパクであり、TGF-8又 はFSH誘導を写レギュレーターとして作用することが 報告されている(TGF-8 or FSH inducible putative t ranscriptional regulator)。

【0061】英駿翔4<sub>、</sub>TYS総胞のベスナリノン処理 によるTSC-22 mRNA発現の誘導

(1) TYS細胞をベスナリノンで処理することによっ

て誘導されるTSC-3.2 mRNAの発現をノーザンプ ロット分析を用いて調べた。

【0062】異体的には、TYS総数をベスナリノン(50μg/mlDMEM)で処理し、次いで該TYS総数から縮度質RNAを設置し、1%変性アガロースデル上で電気活動した。それをナイロンフィルターに転写し、ヒトTSC-22及びターアクチン用のドロー機能プローブにハイブリダイズし、オートラジオグラフィーによりTSC-22mRNAの発現状況を調べた。また、得られたオートラジオグラフをデンシトメトリック走査計で評価した。また、対照実験としてベスナリノン未処理のTYS総数についても同様にTSC-22mRNA発現を調べた。結果を図3に示す。

【0063】TYS細胞中に、約1.8x5のTSC-22mRNAが検出された。TYS細胞のTSC-22mRNAが検出された。TYS細胞のTSC-22mRNAが低端、無胞がコンフルエンスに減するまで持続的に増加した(図3)。TYS細胞中のTSC-22mRNA発現は、50με/mlベスナリソン処理によって著しく増加した(1日目・コントロールの225%、2日目:コントロールの164%、3日目:コントロールの125%)(図3、B)。また、TSC-22mRNAの誘導はベスナリノン添加機、少なくとも3日間続いた。

【① 0 6 4】 (2) 次いで、ベステリノン処理によるT SC-22mRNAの誘導状況を経時的に退跡した。 第 考として、公知のTSC-23誘導展子であるトランスフォーミング成長因子-81 (TGF-81)を用いて関係に行った。異体的には、1、2、6、12及び24時間の各時間にわたりTYS細胞をベスナリノン及びTGF-81のぞれぞれで処理し、待られたTYS細胞から細胞質BNAを測裂し、該RNA(20xx/レーン)を1%変性アガロースゲルで電気泳動した。次いで、ナイロンフィルターに移し、EトTSC-22及びターアクチン用がよアー整鎖プローブにハイブリディズしてオートラジオグラフィーに供した。得られたオートラジオグラフをデンシドメトリックス速変計で評価した。結果を図4に示す。

【0065】これからわかるように、短時間のベスナリンと処理ではTSC-22mRNAはあまり誘導されないが、24時間処理することによって急激にTSC-22mRNAが適加した(図4、B)。一方、TGF-91処理では、無時間の処理でTSC-22mRNAが選やかに誘導された(図4、B)。

【0067】具体的には、10ヵg/m1のシクロへキシミドの存在又は非存在下で、TYS細胞を2時間、4時間又は6時間の各時間にわたりベスナリノン(50ヵg/m1)で処理し、得られたTYS細胞から細胞質RNAを調製し、1%変性アガロースゲルで電液涂動した(RNA:20ヵg/レーン)、次いで、ナイロンフィルターに製写して、ヒトTSC-22、p21\*\*パ及びβーアクチン用のパアー機線プローブにハイブリダイズしてオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフィーに関した、得られたオートラジオグラフをデンシトメトリック走査計で評価した。対照として、ベスナリノン未処理のTYS細胞についても同様に実験を行った、結果を図うに示す。

【①り68】これからわかるように、10 μg/mlのシクロヘキシミドの処理によって、おそらくはmRNAの蓄積に超図して、TSC-22mRNAの範疇は参しく増加したが、ベスナリノンによるTSC-22遺伝子の誘導は抑制された(図5、8)、一方、ベスナリノンによるp21…り遺伝子の誘導はシクロヘキシミドの処理によって阻害されなかった(図5)。

【0.069】(4)結論

上記で示すように、TSC-22のminNA発現は、数時間ペスナリノンで処様することによってわずかに増加したが、TSC-22minNAの顕著な誘導はペスナリノンの添加後24時間で製築され、それは少なくとも3日間持続した。他方、TGF-81処理では短時間でTSC-22minNAの選やかな誘導が製築された。また、Shibonoss。並びに続加に及び持まけらば、TGF-81又はFSHによるマウス及びラット総数のTSC-22の誘導は、Jun及びFosのように、急激ではあるが一時的なものであると報告している(J. Bioi. (Dem. 267:10219-10234(1992); Endocrinology 134: 1205-1212 (1994)。また我々も、以前ペスナリノンがTYS機能中でTGF-81タンバタの誘導を促進することを報告している(Cascer Leit. 112: 181-169 (1997))。

【0070】これらのことから、少なくとも本発明のと トTYS細胞システムにおいて、ベスナリノンは、初め にその直接的な作用を介してTSC-22mRNAの発 現を誘導し、その後TGF-3等の他のタンパクの産生 そ介して、TSC-22mRNAの発現を増強するよう に掛くと考えられる。

【0071】実験例5\_TSC-22タンパクの検出 (1)TYS総配から認識した100μgのタンパタに ついてSDS-PAGEを行った。ゲルから該タンパタ をエトロセルロースフィルター(別か-Naのに転募した。 腰上のTSC-22タンパクをアフィニティー特製一抗 グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)-TS C-22融合蛋白ウサギボリクローナル抗体及びアマシ ヤムECLキット(Americlas)を用いて検出した。結果 を図6点に示す、図からわかるように、20kDa及び 18kDaの位置に2つのパンドが検出された。塞移動 バンドはTSC-22タンパラめリン酸化フォームのようである。

【0072】(2)また。ベスナリノン処理によるTY S細胞中のTSC-23蛋白発現上昇を開催ELLSAにより認定した。100μgのタンパクを96ウエルナレート (Falcon) に添加し、窒温で3時間インキュベートした。第1 依然 (アフィニティー積製抗GST-TSC-23融合蛋白ウサギ(体: 1:2000) をウエルに添加し、室温で3時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、HRR-コンジュゲートーヒツジ統ウサギI g G (Ascrshas 1:500) をウエルに添加し、室温で1時間インキュペーションした。次いで、100μfのTME (3,3°,5,5°-tetrancibythenzione、0-1ms/mT:Signa) 溶液をウエルに加えて10分間インキュベートした。反応を1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>40

ル1 雑加して停止し、450 nmの吸光度を制定した。 結果を図68に示す。

【0073】かかる圏相ELISA法により、ベステリノン処理によりTYS細胞中に産生されたTSC-22 タンパク量は、本処理の細胞と比較して増加していることが示された。

【〇〇74】実験例6 上トTSC-22mRNAに対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドの、ベスナリノン処理TYS細胞又は未処理TYS細胞への影響 上トTSС-22mRNAに対するアンチセンス・ホスホロチオエートーオリゴヌクレオチド(pixopherothicale-plisonucleotide)およびセンス・ホス市ロチオエートーオリゴヌクレオチドを合成した(表名)。

[0075] [表3]

7970%1.5220ffx-1-5%2 %56%f} : 5 -tgggmittCaTgcamitgca-%

<u> 174-2720122-1-19737012) : 5'-tgcaaftgcATGasetcoom 3'</u>

ベスナリノン処理下YS細胞及び未処理下YS細胞のそれでれを、これらのオリゴヌクレオチドで処理して、細胞増殖に対する影響を測べた、具体的には、TYS細胞がコンフルエンスに達したとき着しくは細胞が急速に増殖した際に、直接培養細胞中にこれらのオリゴヌクレオチドを添加することによって細胞を処理した。細胞の数はMTTアッセイにより評価した。

【0076】結果を図7に示す。これからわかるように、TYS細胞を10μMのセンス・オリゴヌクレオチドで処理することにより、おそらくは高翔量のオリゴヌクレオチドの非特異性無胞毒性に起悶して、細胞の増殖がわずかに延客された。しかしながら、等濃度のアンチセンス・オリゴヌクレオチドによる処理はTYS細胞の増殖を促進した(p<0.01)、さらに、アンチセンス・オリゴタクレオチドはTYS細胞に対するベスナリノンの抗増維作用を抑制した。ただし、この実験において、TYS細胞のベスナリノンによる処理は、細胞がコンフルエンスに達した時に開始したため。ベスナリノンのTYS細胞に対する抗増殖効果は図1に示される整度くなかった。

【0077】一方。TYS細胞を、低密度培養条件下(2×10<sup>1</sup>/ウエル)、ベスナリノンの存在若しくは 非存在下で、アンチセンス・オリゴヌクレオチドで処理 した場合、アンチセンズ・オリゴヌクレオチドの明確な 効果を示すことはできなかった。図3に示すように、T YS細胞中のTSC-22mRNAの発現は、低密度培 養業件下で非常に低かったが、細胞がコンフルエンスに 達するまで値々に増加し、このことからアンチセンス・ オリゴヌクレオチドは高密度培養条件下で、TYS細胞 中のTSC-22mRNAの発現を複効に関等したと考 えられる。

【0078】以上の家職から、次のように考察される。

【0079】下SC-23mRNAの発現レベルは、培養の細胞癌度及び細胞サイクルによく比例した。下SC-22mRNAのレベルは増殖環境下では低かったが、細胞がコンフルエントに達するとmRNAしていは著しく増加した。ベスナリノンは丁YS細胞中のTSC-22mRNAに対するアンチセンス・オリゴスクレオチドは、細胞がコンフルエントに達した後に丁YS細胞の増殖を促進し、ベスナリノンの抗増瘤効果を抑制した。これらのことから、下SC-22はTYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞株の成長・増殖をマイナスに制御し、TYS細胞においてベスナリノンからの増殖阻率シグナルを、少なくとも一部において、媒介していると思われる。

【0080】とトTSC-23タンパクのアミノ酸配列 は、マウス及びラットの配列と98%一致した(1アミ ノ酸の挿入、1アミノ酸の覆盤)、このように種を越え て高い割合でアミノ酸配列が保存されていることは、T SC-22が、細胞成長ノ増殖、分化及びアポトーシス といった細胞作用の制御に重要な果たしていることを示 している。

【0081】Shibanusa、並びにHasil及びBallらば、と トTSC-22タンパクはまたロイシンジッパードメインのN末端の塩蒸性領域を欠乏していることを報告している(J.Biol.Chem.267:10219-10224(1992); Endocriso logy 134: 1205-1212(1994)。このことから、とトTSC-22は、CHOP(Genes Dev. 6:439-453(1992))又はIP-1(feli 64: 983-993(1991))のように、塩基性のロイシンジッパー転写因子と相互作用し、ドミナントネガティブ制御選子として作用していると考えられる。CHOPは転写因子のC/EBPファミリーとホモロジーがあり、GADD(Growth Arrest and DR

A Shamager) 1 5 B としても知られており (Mol. Cell. PS 이 9: 4196-4203 (1989))、またC/EBPのドミナ ントネガティブインヒビターとして作用する (Genyes De V.6: 439-453 (1992); Genes Dev. 8:453-464 (199 d)。該CHOF (GADD 153) 適能子の転取は、 成長抑制またはDNAグメージを引き起こす疑つかの試 薬によって誘導される(Mol. Cell.Sigt.9: 4196-4203 (1989))。加えて、ドミナントレギュレーター1 d kld D NA結合領域を欠如したヘリックス・ループ・ヘリックス 議台であり、細胞成長及び分化の制御についての研究が B123117116 (fell 61:47-5) (1990)). Ids (101、102、103及び104)は特異的にヘリ ッタスーループーペリックス蛋白(MyoD。E2A、 E12及びE47)に結合し。DNA統合能力を開答す & (Nucleic Acids Research 22:749-755 (1994)) .. I dəli新形成(Gell 51:19-59 (1990): J. Biol. Cless. 269:6031-6039(1994))。神経形成(Diochem, Bloodys。 fics.Commun.199:1355-1362(1994))及び血液形成(Cel 1 79:893-900 (1994) ) 並びに細胞成長/増殖 (Proc. No

配列

AGCCAGTCTG CAGCTGGGCC TGAA.

原列番号:2 配列の長さ:25

配列の型:枯酸

額の数:一本額

肥熟

TUTGUAGUTG GGUTGAAAC TGGGC

配列斯号:3

配列の長さ:20

配列の型: 核酸

類の数十一本額

88 98 88

ATCTAGITTE AACCAGGCTG

经列基号:4

配列の長き:20

配列の型:核酸

質の数:一本語

TAATACGACT CACTATAGGG

配列等号:5

配列の長さ:20

配列//型:核酸

1970年:一本10

8271

TEGGATTICA TECANTISCA

**EMT** # : 6

**経剤の長き:20** 

配列の型:核酸

鏡の数:一本錐

U. Acid. Sci. USA 91:4985-488(1994)) を含む機つか の細胞システムにおける分化を制御する。 【0083】このようにTSC-22は、これらの分字

【0083】このようにTSC-22は、これらの分字 と同様にドミナントネガティブ制御房子である可能性が 高く、多くのロイシンジッパー転写語学の機能を描書す ることによって種々の生物現象に称響を与えると考えら れる、また、本発明のTSC-22結時削はその務め面 日質が関与する疾患の治療・予防に有用である。

[0083]

[段列表]

配别番号:1

置列の長さ:24

配列の盟:核酸

第42款:一本額

トボロジー:複雑状

配列の種類:他の核的 合成DNA

配列の特象

特徵是表才記号: priser

24

トボロジー:面類状

配列の推奨:他の核酸 合成的4

配列の特徴

特徵全表才記号: primer

25

トポロジー:直鎖状

凝例の種類:他の核酸 合成0%

要別の特徴

特徵を表す記号: primer

20

トボロジー:直接状

配列の種類:他の核酸 合成INA

劉利の特徵

特徵全载才記号: promoter

30

上ボロジー: 商籍状

配列の種類:他の枝約 合成DNA

配列の特徴

特徵于表才記号: modified base

20

トボロジー:直鎖鉄

配列の種類:他の核酸 合成0%

配列の特徴

特徵を表文記号:modified base

**32.74** 

#### 【協画の簡単な説明】

【図1】 TYS細胞のインビトロ増殖に対するベスナリ ノンの影響を示す器である。値はも回測定した平均値を 示す、\*p<0,01 \*\*堵地中のベスナリノンの激度 (ロz/ai)。

【図2】TYS細胞の細胞周膜解析を示す図である。図中Aは、TYS細胞をベスナリノン非存在下で34時 選、48時間及び73時間培養した結果を、また図中部 はTYS細胞を50μg/m1ベスナリノン存在下で3 4時間、48時間及び72時間培養した結果を示す。

【図3】TYS線整中のTSC-22のmRNA発展に対するベスナリノンの影響を示す図である。Aは、ベスナリノン(50点 g/m))処理TYS総額(+)及は未処理TYS総額(-)から総数質RNAを調製し、1%変性でガロースゲル上で分離し(RNA:20μg/レーン)、ナイロン酸に移して、ヒトTSC-22及びβーアクチン崩のジアー保験プローブにハイブリダイズした結果を示す額面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンシトメトリックスキャニングで測定した結果を示す。

【図4】下YS線製中での、ベスナリノン及びTGFー β1によるTSC-22mRNAの誘導の報時間の経時 変化を示す図面である、Aは、図に示す時間(1,2。 6,12,34時間)ベスナリノン又はTGFーβ1で処理 したTYS総製から細胞質ドNAを調製し、該RNA (20μがレーン)を1%変性アガロースゲル上で分類して、テイロシ膜に移し、次いでモトTSC-22及びβーアクチン用の1Pー構造プローブにハイブリゲイズした結果を示す団面に代わる写真である。Bは、Aで示すオートラジオグラフをデンシトメトリックスキャニング で測定した結果を示す。

【図5】TYS細胞中での。TSC-22及びp31 \*\*\*1の誘導に対するシクロヘキシミドの影響を示す図で

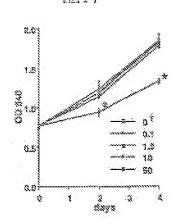
2

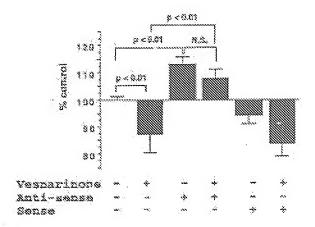
ある。Aは、10μg/m1のシクロへキシミドの存在 又は非存在下で図に示す時間(2、4、6時間)ベスナ リノン(50μg/m1)で処理したTYS細胞(+) 又は未処理のTYS細胞(-)から細胞質RNAを測疑 し、1%変性アガロースゲル上で分面し(RNA:20μ ルレーン)、ナイロン際に移して、ヒトTSC-22、 p21\*\*\*及びカーアクナン用の\*\*P一組織プローブに ハイブリダイズした結果を示す図面に代わる写真である、日は、Aで示すオートラジオグラフをデンシトメト リックスキャニングで測定した結果を示す。

[M6] AU TYS#MAOTSC-2292/72 ウススタンプロッティングによって検出した結果を示す 図面に代わる写真である。TYS細胞に由来する100 A. エのタンパグサンアル(TYS)または精製組換えG ST-TSC-22/2/2/100 ng (GST-TSC-22)をSDSーPAGEに携し、コトロモルロース膜 た移し、アフィニティー構製抗-GST-TSC-22抗 体で染色した。Bは、細胞中のTSC-22タンパクの 間相としてSA送による検出結果を示す。図中、コント ロールは未処理TYS細胞から調製された100点ェク ンバク、DMSOは6.5%DMSOで48時間処理し たTVS網際から網票された100ヵgタンパク、Ve sは50点g/m 1ベスナリノンで48時間処理したT YS細胞から調製された100μgタンパクの結果をそ れぞれ示す。確認、それぞれ2回週定した平均値を示 す。図中の挿入図は拡原としてGST-TSC-23融合 タンパクを用いた関組ELISA用のスクンダードカー ブを深す。

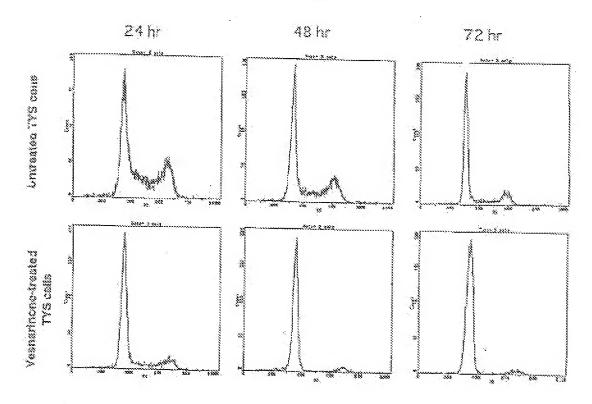
【図7】ヒトTSC-22mRNAに対するアンテセンスオリゴヌクレオチドにペスナリノン処理又は未悉理TYS細胞に対する影響を示す認而である。数額は、6回試験した結集の平均を示す。

IMII





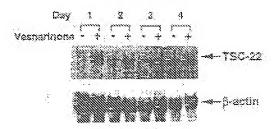
[32]

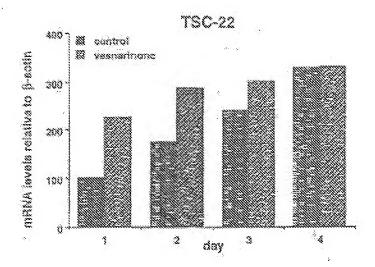


[13]

Ä

国面代用写真

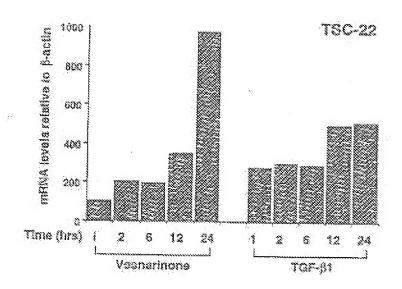




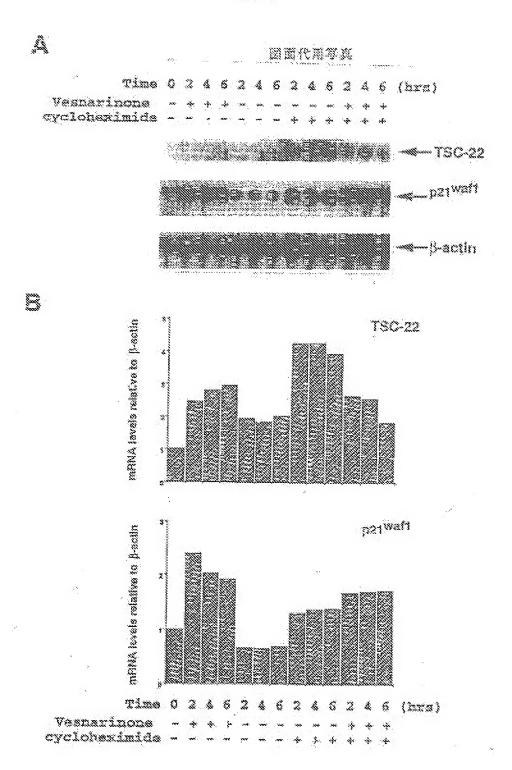
[2]4]

A

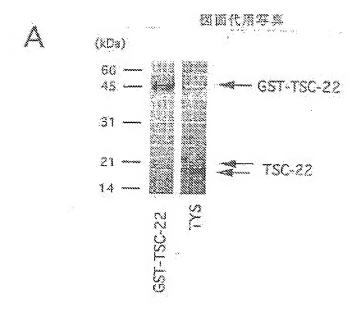
图面代用写真

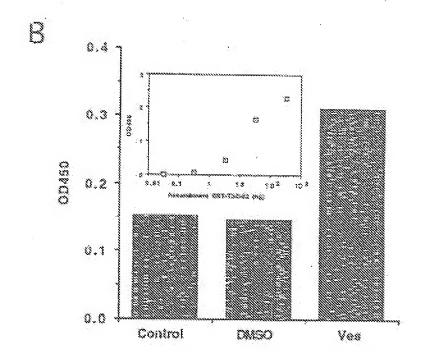


## [2]5]



[26]





プロントページの続き

(51) Int. 61, 6 // CO7D 215/22

MAKE 6

FI

CO7D 215/22

www.menesty.com (in the proposition of the